Archive of SID

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۲۷، شماره ۲، تابستان ۹۶، صفحات ۱۱۹ تا ۱۲۵

Original Article

شناسایی ژن‌های cmlA/tetR ، bla PSE-1 و blaTEM و sip B در سویه‌های سالمونلا با روش Multiplex-PCR و تعیین الگوی مقاومتی آنها

محمد رضا نجفی[۱]، مهدی پرویز[۲]، کیومرث امینی[۳]

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی
[۲] مربی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی
[۳] استادیار، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه، واحد ساوه، دانشگاه آزاد اسلامی

چکیده

سابقه و هدف: *گاستروانتریت ناشی از سالمونلا در انسان‌ها شایع است و به عنوان یک معضل جهانی در بهداشت عمومی مطرح است. این مطالعه به منظور شناسایی شناسایی ژن‌های cmlA/tetR، bla PSE-1 و blaTEM و sip B در سویه های سالمونلا با روش Multiplex-PCR و تعیین پروفایل آنتی بیوتکی آنها انجام شد.*

روش بررسی: *در این مطالعه توصیفی-مقطعی، تعداد ۱۶۳ نمونه کلینیکی از بیماران ارجاع داده شده به بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) جمع آوری شد. تست حساسیت آنتی بیوتیکی با استفاده از روش انتشار از ژل و بر اساس دستورالعمل CLSI انجام شد. سپس M-PCR با استفاده از توالی های الیگونوکلئوتیدی ویژه برای شناسایی ژن‌های تحت مطالعه انجام شد.*

یافته‌ها: *از ۱۶۳ نمونه جمع آوری شده، ۴۸ (۲۹/۴٪) سالمونلا به دست آمد که ۲۵ (۵۲/۱٪) سویه سالمونلا اینتریتیدیس، ۱۴ (۲۹/۲٪) سالمونلا تایفی موریوم و ۹ (۱۸/۷٪) سالمونلا اینفنتیس بودند. آنالیز مقاومت آنتی بیوتیکی نشان داد که بیشترین مقاومت مربوط به مربوط به تتراسیکلین (۲۷ جدایه؛ ۵۶/۲٪) و پس از آن استرپتومایسین و کلرامفنیکل (۱۵ ایزوله؛ ۳۱/۲٪) بود. تمامی ایزوله‌ها (۴۸ جدایه؛ ۱۰۰٪) به ایمی‌پنم، آمیکاسین، جنتامایسین و تریمتوپریم/سولفامتوکسازول حساس بودند. نتایج M-PCR مشخص کرد که ۶۲/۵٪ و ۱۶/۶٪ از گونه های سالمونلا به ترتیب حامل ژنهای cml/tetR و sipB بودند.*

نتیجه‌گیری: *تشخیص و تعیین ژنوتیپ ژن‌های حدت و مقایسه آن با وضعیت جهانی یک نیاز اساسی در کنترل و پیشگیری از بروز سالمونلوز در مقاصد صنعتی است.*

واژگان کلیدی: *cmlA/tetR, PSE-1, TEM و sip B، سالمونلا، Multiplex-PCR.*

مقدمه

سالمونلاها، باسیل‌های گرم منفی، بی هوازی اختیاری غیراسیدفست و بدون اسپور و دارای فلاژل هستند که بیش از ۲۵۰۰ سروار مختلف دارند و در سه گونه مجزا تقسیم بندی می‌شوند: سالمونلا تیفی، سالمونلا کلراسوییس و سالمونلا انتریکا (۱). سالمونلا انتریکا، زیرگونه انتریکا سروتیپ انتریتیدیس به اختصار سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا انتریکا زیر گونه انتریکا سروتیپ تایفی موریوم به اختصار سالمونلا تایفی موریوم، مهم‌ترین عامل در ابتلا به سالمونلوزیس است که شامل طیف وسیعی از عفونت‌ها، از جمله تب تیفوئید، سپتی سمی، گاستروآنتریت، مسمومیت غذایی هستند (۲، ۳). از عوامل بیماری‌زایی سالمونلا می‌توان به زنده ماندن و تکثیر آنها در درون ماکروفاژها اشاره کرد. از مهم‌ترین فاکتورهای

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه ، دانشکده علوم پایه، گروه میکروبیولوژی، مهدی پرویز (**email**: dr_parviz89@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۹/۷
تاریخ پذیرش مقاله: ۹۶/۱/۳۰

www.SID.ir

Archive of SID

بیماری‌زایی این ارگانیسم، پروتئین های sip و sop هستند که توسط مسیر ترشحی تیپ III (T3SS) ترشح می‌شوند (۴).

گاستروانتریت ناشی از سالمونلا یکی از رایج‌ترین عفونت‌های ناشی از این ارگانیسم است (۵). شروع این علایم ناگهانی از ۱۲ ساعت تا یک هفته متغیر است. طول دوره بیماری ۷-۴ روز به طول می‌انجامد. مصرف آنتی بیوتیک در درمان گاستروانتریت غیرتیفی توصیه نمی‌شود؛ زیرا که بیماری اغلب به صورت خود محدود شونده مهار می‌شوند، اما در عفونت‌های شدید از قبیل مننژیت، باکتریمی و آرتریت در بالغین، افراد مسن و افراد با ایمنی سرکوب شده مصرف آن ضروری است. از مهم‌ترین آنتی بیوتیک‌هایی که امروزه در درمان مورد استفاده قرار می‌گیرند، آنتی بیوتیک‌های گروه بتالاکتام هستند. متاسفانه بنا به دلایلی، از جمله افزودن آنتی بیوتیک به جیره غذایی دام‌ها، استفاده نادرست، بیش از حد و خودسرانه آنتی بیوتیک‌ها و عدم نظارت دقیق در تجویز دارو سبب بروز سویه-های مقاوم به آنتی بیوتیک شده است (۶). سفالوسپورین‌های نسل سوم به دلیل تأثیر بهینه و مقاومت کم باکتری ها به آنها به خصوص در کودکان و به دلیل محدودیت مصرف کینولون-ها، اغلب برای درمان عفونت‌های شدید تجویز می‌شوند. مکانیسم مقاومت به بتالاکتام در باکتری‌ها از طریق ایجاد موتاسیون در پروتئین های اتصالی به پنی سیلین (PBP)، تغییر نفوذ پذیری غشا، خروج فعال دارو از سلول (افلاکس پمپ) و تولید آنزیم های بتالاکتاماز است. بتالاکتامازها آنزیم-هایی هستند که با هیدرولیز هسته مرکزی حلقه بتالاکتام سبب غیرفعال شدن این آنتی بیوتیک‌ها می‌شوند. آمبلر این آنزیم‌ها را بر اساس ساختمان اولیه‌شان به ۴ گروه (A-D) تقسیم بندی کرد که نوع B متالوبتالاکتاماز (MBLs)، نوع C همان سفالوسپورینار و نوع A همان بتالاکتامازهای وسیع الطیف (ESBL) هستند (۷،۸). در گروه A بتالاکتامازی آمبلر و کلاس be2 و b2 از طبقه بندی بوش بتالاکتامازهایی مانند TEM و PSE قرار دارند (۹). شناسایی بتالاکتامازها در نمونه های بالینی بر اساس طیف اثر، میزان تولید آنزیم و تنوع فعالیت آنزیمی در باکتری های حامل، اهمیت زیادی در درمان یا جلوگیری از شیوع آنها در جامعه دارد. گزارش‌های متعددی از مقاومت سالمونلا به بتالاکتام‌های وسیع الطیف در سراسر دنیا به ثبت رسیده است. در کشور ما نیز گزارش‌هایی از مقاومت سالمونلا به بتالاکتام‌ها دیده شده است که علت آن را می‌توان به مصرف بی رویه و تجویز نادرست دارو توسط افراد و متخصصین، به ویژه در تغذیه حیوانات نسبت داد. مهم ترین مکانیسم مقاومت علیه این داروها، انتقال ژن‌های بارز کننده مقاومت از طریق پلاسمیدهایی است که اغلب در باکتری‌های انتریک حضور دارند و فعالیت خود را از طریق آنزیم های متعدد بیان می‌کنند. شناسایی سوبسترای مناسب دارویی برای این آنزیم‌ها از بروز سویه‌های مقاوم و شیوع آنها، شکست درمان و صرف هزینه های کلان درمانی جلوگیری می‌کند.

بنابراین هدف از انجام پژوهش پیش رو، ردیابی ژن‌های شناسایی ژن‌های cmlA/tetR، PSE-1و TEM و sop B در سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم با روش Multiplex-PCR و تعیین پروفایل مقاومتی این سویه‌ها است.

مواد و روشها

جداسازی باکتری

در این مطالعه توصیفی – مقطعی (Cross-sectional) که در طی یک بازه زمانی ۲۱ ماهه از ابتدا تا انتهای سال ۱۳۹۴ انجام شد، تعداد ۱۶۳ نمونه بالینی مختلف از جمله مدفوع، خون، ادرار و مایع مغزی نخاعی (CSF) از بیماران مشکوک به عفونت سالمونلا از برخی از بیمارستان آموزشی درمانی حضرت رسول اکرم (ص) تهران جمع آوری شد. معیار ورود به مطالعه، علایمی از قبیل دل درد، اسهال، استفراغ، درد شکم و تب بودند. در مورد هر نمونه اطلاعاتی مثل سن، جنس، تاریخ نمونه گیری، درجه حرارت و سابقه احتمالی ابتلا یا درمان، نوع تغذیه و محل سکونت اخذ و ثبت شد. نمونه‌های بیماران در شرایط استریل و با استفاده از محیط انتقالی راپاپورت به آزمایشگاه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه منتقل شدند. تمامی نمونه‌ها ابتدا بر روی محیط‌های اختصاصی و افتراقی از قبیل XLD و SS آگار کشت و به، مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. کلونی‌های مشکوک به سالمونلا به محیط سلنیت F (SF) انتقال و سپس با استفاده از تست‌های روزمره و استاندارد بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی مانند TSI، اوره، سیمون سیترات آگار و MRVP تایید شدند. آزمون سروتایپینگ برای مشخص کردن آنتی ژن‌های سوماتیک (O)، فلاژله (H) و کپسولی (Vi) با استفاده از آنتی سرم‌های مونو والان به روش Slide agglutination و با استفاده از جدول کافمن-وایت انجام شد. تمامی محیط‌های فوق ساخت شرکت مرک آلمان است. از سویه رفرانس سالمونلا تایفی موریوم ATCC 14028 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی

پروفایل حساسیت آنتی بیوتیکی سویه‌ها با استفاده از روش انتشار از دیسک برای آنتی بیوتیک‌های (Mast، انگلیس)؛ نیتروفورانتوئین، تتراسیکلین، ایمی پنم، آمیکاسین، استرپتومایسین، جنتامایسین، آموکسی‌کلاو، کلرامفنیکل، تریمتوپریم/ سولفامتوکسازول، آمپی سیلین و سفتریاکسون بر اساس دستورالعمل استاندارد آزمایشگاه و بالین (CLSI., 2013) انجام شد (۱۰). بدین منظور پس از تهیه کدورتی معادل نیم مک فارلند، کشت چمنی ایزوله‌ها با استفاده از سوآپ استریل پنبه‌ای بر روی محیط مولر هینتون آگار (مرک، آلمان) انجام شد. دیسک‌های آنتی بیوتیکی با پنس استریل در سطح محیط قرار گرفتند و گرمخانه گذاری به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام شد. بعد از آن قطر هاله عدم رشد با استفاده از کولیس اندازه گیری شد و به صورت مقاوم (R)، نیمه حساس (I) و حساس (S) ثبت شد.

واکنش زنجیر های پلیمراز چندگانه

به منظور استخراج DNA سلولی، تمامی جدایه‌ها به مدت یک شبانه روز بر روی محیط لوریا برتانی براث (مرک، المان) کشت داده شد. سپس، استخراج DNA ژنوم طبق دستورالعمل شرکت سازنده و با استفاده از (AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit Bioneer، کره) انجام شد. به منظور ردیابی ژن‌های تحت مطالعه در سویه‌های سالمونلا تایفی موریوم جدا شده از نمونه‌های غذایی با استفاده از روش MPCR از توالی-های اختصاصی الیگونوکلئوتیدی پرایمرهای موجود در جدول ۱ استفاده شد (جدول ۱) (۱۱). در نهایت، واکنش Multiplex-PCR به حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر شامل ۶/۵ میکرولیتر PCR master mix 5X (سیناکلون، ایران) حاوی (0.05 U/µl) Taq DNA polymerase، (3 mM MgCl2) و (0.4mM) dNTPs، 7/0 میکرولیتر از هر یک از پرایمرها به غلظت ۰/۸ میکرومولار، ۰/۹ میکرولیتر از DNA الگو (۱۰ نانو گرم) و ۱۲ میکرولیتر آب دیونیزه استریل با استفاده از گرادیانت ترموسایکلر(اپندورف، آلمان) برای ۳۱ سیکل به صورت زیر انجام گرفت: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها در ۵۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۵ ثانیه و مرحله طویل سازی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۹۰ ثانیه. در پایان، محصولات واکنش M-PCR در ژل آگارز ۱٪ حاوی اتیدیوم بروماید (۰/۵ µg/ml) در مقایسه با سویه استاندار سالمونلا تایفی موریوم ATCC 14028 الکتروفورز شد.

یافته‌ها

ایزولاسیون باکتری

نتایج نشان داد که از مجموع ۱۶۳ نمونه تحت مطالعه، تعداد ۴۸ سویه (۲۹/۴٪) سالمونلا به دست آمد. داده های حاصل از آزمون آگلوتیناسیون اسلایدی نشان داد که ۲۵ جدایه (۵۲/۱٪) متعلق به سروتیپ اینتریتیدیس، ۱۴ سویه (۲۹/۲٪) متعلق به سروتیپ تایفی موریوم و ۹ سویه (۱۸/۷٪) دیگر نیز متعلق به سروتیپ اینفنتیس بود. از مجموع ۴۸ سالمونلای ایزوله شده، ۲۶ مورد مذکر (۵۴/۲٪) و ۲۲ مورد (۴۵/۸٪) مونث بودند. از نظر نوع و ماهیت نمونه، ۷۹ نمونه مدفوعی و بقیه مربوط به خون، ادرار و CSF بودند.

پروفایل مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی

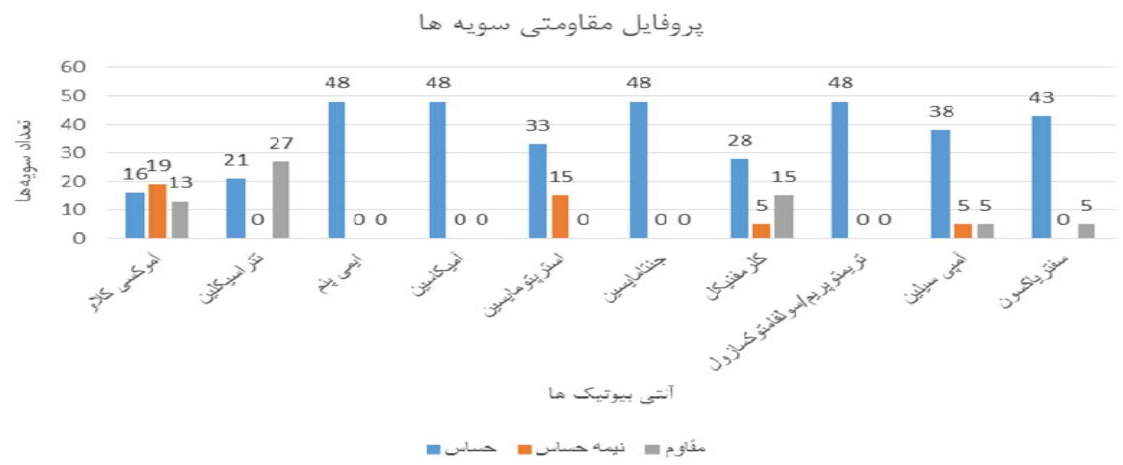
نتایج آزمون حساسیت آنتی بیوتیکی برای آنتی بیوتیک‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک تتراسیکلین (۲۷ جدایه؛ ۵۶/۲٪) و پس از آن استرپتومایسین و کلرامفنیکل (۱۵ ایزوله؛ ۳۱/۲٪) بود. تمامی ۴۸ جدایه سالمونلا (۱۰۰٪) به آمیکاسین، ایمی پنم، جنتامایسین و تریمتوپریم/سولفامتوکسازول حساس بودند؛ لذا

جدول۱. ترادف نوکلئوتیدی پرایمرهای مورد استفاده

Target genes	Primer sequence (5′→3′)	Amplicon size (bp)
SipB/C	F=5′-ACAGCAAAATGCGGATGCTT-3′ F=5′GCGCGCTCAGTGTAGGACTC-3′	232
CmlA/tetR	F=5′-CGCTCCTTCGATCCCGT-3′ F=5′-GCTGCGTTCATCTACAACAGAT-3′	260
PSE-1	F=5′-TTTGGTTCCGCGCTATCTG-3′ F=5′-TACTCCGAGCACCAAATCCG-3′	132
TEM	F=5′-GCACGAGTGGGTTACATCGA-3′ F=5′-GGTCCTCCGATCGTTGTCAG-3′	291

www.SID.ir

Archive of SID



نمودار ۱. پروفایل مقاومت و حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های تحت مطالعه

جدول ۲. فراوانی ژنهای هدف در سروتیپ های مختلف سالمونلای تحت مطالعه

تعداد (٪) جدایه های حامل ژن	ژنهای هدف			
	cmlA/tetR	*bla PSE-1*	*bla*$_{TEM}$	*sipB*
سالمونلا انتریتیدیس (N;25, 52/1%)	۱۷ (٪۶۸)	۷(٪۲۸)	۲۰(٪۸۰)	۴(٪۱۶)
سالمونلا تایفی موریوم(N;14, %29/2)	۷(٪۵۰)	۲(٪۱۴/۳)	۵(٪۳۵/۷)	۳(٪۲۱/۴)
سالمونلا اینفنتیس(N; 9, 18/7%)	۶(٪۶۶/۶)	۰(٪۰)	۳(٪۳۳/۳)	۱(٪۱۱/۱)
مجموع(N; 48, 100%)	۳۰(٪۶۲/۵)	۹(٪۱۸/۷)	۲۸(٪۵۸/۳)	۸(٪۱۶/۶)

می‌توان نتیجه گرفت که از این آنتی بیوتیک‌ها به عنوان انتخاب اول در درمان استفاده کرد. همچنین ۴۳ جدایه (٪۸۹/۵) از مجموع ۴۸ ایزوله سالمونلای جداسازی شده نسبت به سفتریاکسون حساس بودند (نمودار ۱).

Multiplex-PCR

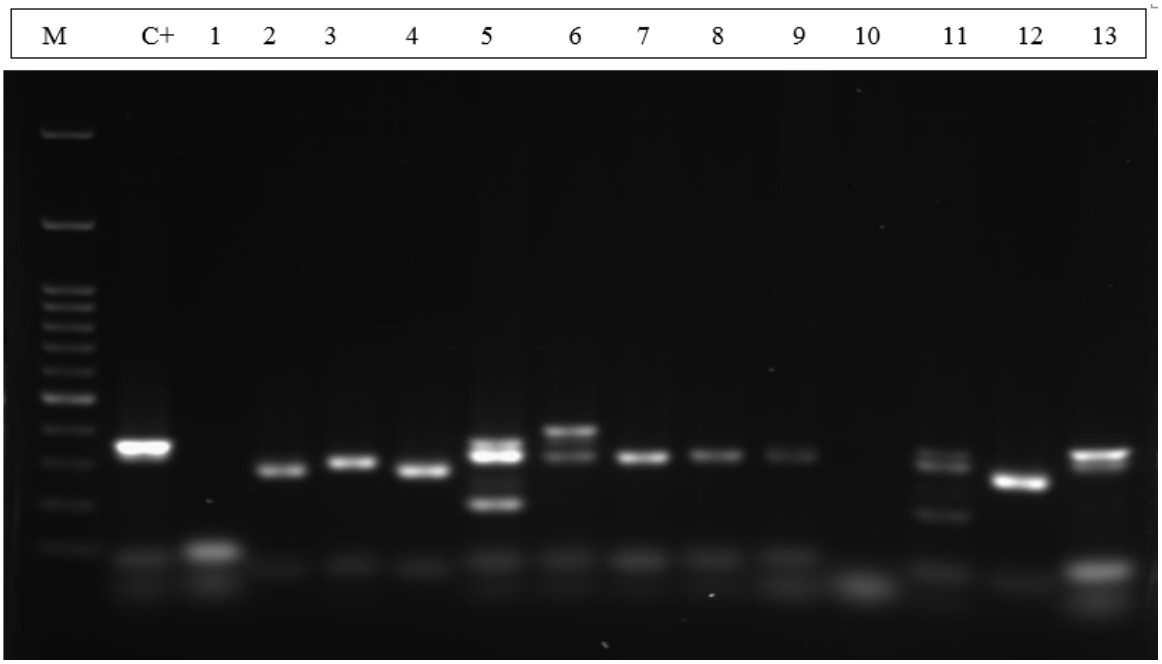
نتایج حاصل از آزمون M-PCR به منظور تکثیر ژن‌های PSE-1، cml/tetR، TEM و sipB بر روی تمامی ایزوله‌های سالمونلای شناسایی شده با استفاده از آزمون‌های تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی نشان داد که ژن cml/tetR بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها (٪۶۲/۵) دارد، به طوری که در سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس به ترتیب برابر ٪۶۸ (۱۷ سویه)، ٪۵۰ (۷) و ٪۶/۶ (۶ سویه) به دست آمد. همچنین، کمترین فراوانی در بین جدایه‌ها (٪۱۶/۶) مربوط به ژن sipB بود، به طوری که ۴ جدایه (٪۱۶) از سالمونلا انتریتیدیس، ۳ ایزوله (٪۲۱/۴) از سالمونلا تایفی موریوم و نیز ۱ جدایه (٪۱۱/۱) از سالمونلا اینفنتیس حامل این ژن بودند. نتایج حاصل از الکتروفورز محصول M-PCR در جدول ۲ و شکل ۱ ارائه شده است.

بحث

در سال های اخیر سالمونلاهای غیرتیفوییدی در سطح جهان به طور وسیعی شیوع پیدا کرده و به نظر می‌رسد علت آن پیدایش بسیاری از سروتایپ‌های جدید سالمونلا است که در گذشته چندان شیوعی نداشته است. به طور سالیانه سالمونلوزیس درصد قابل توجهی از عفونت های انسانی به خصوص در اطفال و افراد مسن را به خود اختصاص می‌دهد (۱۲). نتایج مطالعه پیش رو نشان داد که تعداد ۴۸ سویه (٪۲۹/۴) سالمونلا از مجموع ۱۶۳ نمونه تحت بررسی به دست آمد، که ۲۵ جدایه (٪۵۲/۱) متعلق به سروتیپ اینتریتیدیس، ۱۴ سویه (٪۲۹/۲) متعلق به سروتیپ تایفی موریوم و ۹ سویه (٪۱۸/۷) دیگر نیز متعلق به سروتیپ اینفنتیس بود. این نتایج با مطالعه رنجبر و همکارانش (۱۳) همخوانی دارد.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۱. نتیجه آزمایش PCR بر روی تعدادی از جدایه های مثبت(سویه های شماره ۴-۱، سامونلا انتریتیدیس، ۹-۵، سالمونلا تایفی موریوم و ۱۳-۱۰ سالمونلا اینفنتیس) ، به ترتیب از چپ به راست: مارکر ۱۰۰ bp، + کنترل مثبت، ، ژن (bla PSE-1) با طول باند 132 bpدر نمونه شماره PTb2، ژن cmlA/tetR با طول باند 260 bp، ژن blaTEM با طول باند 291 bp و ژن SOP با طول باند 232 bp می-باشند.

مقاومت به بتالاکتام‌ها در گونه‌های جنس سالمونلا در ابتدا به واسطه تولید و کشف بتالاکتاماز مطرح شده است. نتایج آزمون کربی-بائر برای آنتی بیوتیک‌های مختلف نشان داد که بیشترین میزان مقاومت مربوط به تتراسیکلین (۲۷ جدایه؛ ۵۶/۲٪) و پس از آن استرپتومایسین و کلرامفنیکل (۱۵ ایزوله؛ ۳۱/۲٪) بود. هیچگونه مقاومتی نسبت به ایمی‌پنم، آمیکاسین، جنتامایسین، تریمتوپریم/سولفامتوکسازول و استرپتومایسین در بین جدایه ها مشاهده نشد؛ لذا می‌توان نتیجه گرفت که می‌توان از این آنتی بیوتیک‌ها به عنوان انتخاب اول (First choice) در درمان سالمونلوز استفاده کرد.

در مطالعه انجام شده توسط رنجبر و همکارانش (۱۴) در سال ۱۳۸۸ هیچ کدام از جدایه های سالمونلای جدا شده از انسان به ایمی پنم و جنتامایسین مقاومت نشان ندادند. در مطالعه انجام شده توسط رنجبر و همکاران، هیچ کدام از سویه های سالمونلا به ایمی پنم مقاومت نشان ندادند و تنها ۱/۵ درصد از سویه‌ها به آمیکاسین مقاوم بودند. در مطالعه عبدالهی و همکاران نیز در ۶۰ سویه سالمونلای تحت مطالعه، ۴۷ نمونه (۴۹٪) دارای مقاومت به آمپی سیلین بودند (۱۵). در مطالعه Wang و همکارانش (۱۶) نیز مقاومت به سیپروفلوکساسین در بین جدایه‌های سالمونلا ۶۰٪ گزارش شد. در مطالعه این محققین نیز هیچ مقاومتی به سیپروفلوکساسین و ایمی پنم مشاهده نشد. این نتایج با مطالعه پیش رو مطابقت دارد. اما Vo و همکارانش (۱۷) در سال ۲۰۰۶ در هلند با مطالعه بر روی سالمونلاهای غیرتیفوئیدی جدا شده از انسان و حیوان مقاومت آنتی بیوتیکی به آمپی سیلین، تتراسیکلین، استرپتومایسین، تری متوپریم سولفونامیدها و نالیدیکسیک اسید را شایع و رو به افزایش گزارش نمودند که با مطالعه فعلی مغایرت دارد و این اختلاف می‌تواند در نتیجه مسافت جغرافیایی و منشا نمونه‌ها باشد.

نتایج حاصل از آزمون M-PCR به منظور تکثیر ژن‌های PSE-1, cml/tetR، TEM و sipB بر روی تمامی ایزوله‌های سالمونلا نشان داد که ژن cml/tetR بیشترین فراوانی را در بین جدایه‌ها (۶۲/۵٪) دارد، به طوری که در سالمونلا انتریتیدیس، سالمونلا تایفی موریوم و سالمونلا اینفنتیس به ترتیب برابر ۶۸٪ (۱۷ سویه)، ۵۰٪ (۷) و ۶/۶٪ (۶ سویه) بود. همچنین، کمترین فراوانی در بین جدایه ها (۱۶/۶٪) مربوط به ژن sipB بود، به طوری که ۴ جدایه (۱۶٪) از سالمونلا انتریتیدیس، ۳ ایزوله (۲۱/۴٪) از سالمونلا تایفی موریوم و نیز ۱ جدایه (۱۱/۱٪) از سالمونلا اینفنتیس حامل این ژن بودند. امینی و همکارانش (۱۸) در سال ۲۰۱۰ با استفاده از روش مولتی پلکس PCR

www.SID.ir

Archive of SID

برای تعیین و شناسایی همزمان ژن‌های inv A و spvC کردند. آنالیز نمونه‌ها نشان داد که ژن‌های spvA، spvB و spvC در ۹۰٪ از سالمونلا انتریتیدس جدا شده از منابع انسانی و ۱۰۰٪ در گونه‌های جدا شده از منابع گاوی وجود دارد. Pezzella و همکارانش (۱۹) در سال ۲۰۰۴ در مطالعه‌ای به بررسی ژن-های مقاومت به استرپتومایسین و تتراسیکلین، ترانسپوزون‌ها و پلاسمیدی های جدا شده از سالمونلا انتریکا جدا شده از حیوانات در ایتالیا پرداختند و دریافتند که از ۵۸ سویه، ۸۴٪ مقاوم به استرپتومایسین و ۶۸٪ مقاوم به تتراسیکلین که همگی دارای ژن tetA بودند. Baumler و همکارانش (۲۱) دریافتند که ژن‌های SipA, SopA, SopB, SopD, و SopE2 در تمامی سویه-های سالمونلای تحت مطالعه شرکت کننده در تهاجم سالمونلا انتریکا سروتایپ تایفی موریوم به سلول اپی‌تلیال شرکت دارند. Soo Jin Yang و همکارانش (۱۱) در سال ۲۰۰۲ در کره به بررسی مقاومت ضد میکروبی در سالمونلا انتریکا سروار انتریتیدیس و تایفی موریوم جدا شده از نمونه حیوانی پرداختند. این محققین نتیجه گرفتند که از بین ۴۰ سویه سالمونلا انتریتیدیس و ۲۲ جدایه از سالمونلا تایفی موریوم، ژن‌های TEM و SPE تنها در ۵ جدایه حضور داشت. Dione و همکارانش (۲۲) در سال ۲۰۱۱ با بررسی ژن‌های ویرولانس و مقاومت آنتی بیوتیکی سالمونلاهای غیر تیفوئیدی در گامبیا و سنگال اظهار کردند که ژن‌های بیماری‌زا در سویه‌های جدا شده از منابع مختلف انسانی و دامی حضور دارد و ارتباط مهمی بین ژن‌های ویرولانس sop B، SitC، orfLC، pip D، Pef A و مقاومت به آنتی بیوتیک‌های رایج مورد استفاده در گامبیا و سنگال وجود دارد و باید از آنتی بیوتیک‌ها در انسان وحیوان به طور مناسب و عاقلانه استفاده شود. نتایج به دست آمده از روش M – PCR در مطالعه حاضر با نتایج سایر محققان در نقاط مختلف دنیا خیلی هم خوانی ندارد و این می‌تواند در نتیجه تفاوت در منبع نمونه، تعداد نمونه، سال انجام مطالعه و تفاوت‌های منطقه جغرافیایی باشد.

یکی از مسایل مهم در درمان بیماری‌های عفونی، مقاومت پاتوژن‌ها نسبت به آنتی بیوتیک‌های مختلف است. امروزه افزایش مقاومت به آنتی بیوتیک‌ها یک معضل جهانی است که در اثر مصرف بی رویه و روزافزون داروها رخ می‌دهد و متاسفانه کشور ما هم از این قاعده مستثنی نیست. همچنین تشخیص و تعیین ژنوتیپ ژن‌های حدت و مقایسه آن با وضعیت جهانی یک نیاز اساسی در کنترل و پیشگیری از بروز سالمونلوز در مقاصد صنعتی است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله تمامی نویسندگان مقاله از کارکنان محترم گروه میکروب شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، بخش میکروب شناسی بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص) و آزمایشگاه تحقیقاتی پاسارگاد که ما را در اجرای این پروژه یاری رساندند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌کنیم.

REFERENCES

1. Jamshidi A, Bassami MR, Afshari-Nic S. Identification of Salmonella spp. and Salmonella typhimurium by a multiplex PCR-based assay from poultry carcasses in Mashhad- Iran. Int J Vet Res 2009;3:43-48.

2. Kumar A, Arora V, Bashamboo A, Ali S. Detection of Salmonella typhi by polymerase chain reaction: implications in diagnosis of typhoid fever. Infect Genet and Evol 2002;2:107-10.

3. Bakshi CS, Singh VP, Wood MW, Jones PW, Wallis TS, Galyov EE. Identification of SopE2, a Sal-monella secreted protein which is highly homologous to SopE and involved in bacterial invasion of epithe-lial cells. J Bacteriol 2000;182:2341-4.

4. Kay RS, Vandevelde AG, Fiorella PD, Crouse R, Blackmore C, Sanderson R, et al. Outbreak of health care – associated infection and colonization with multidrug –resistant Salmonella enterica serovar Senftenberg in florida. Infect Control Hosp Epidemiol 2007;28:805-811.

5. Shaigan nia S, Rostami F, Safarpour dehkordi F, Rahimi E, Yahaghi E, Khodaverdi Darian E, et al . Isolation and Evaluation Virulence Factors of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis in Milk and Dairy Products. Iran J Med Microbiol 2014;8:54-61.

6. Muhammed M, Muhammed LU, Ambali AG, Mani AU, Azard S, Barco L. Prevalence of Salmonella associated with chick mortality at hatching and their susceptibility to antimicrobial agents. Vet Microbiol 2010;140:131-5.

7. Fluit AC. Towards more virulent and antibiotic resistant Salmonella. Immunol Med Microbiol 2005;43:1-11.

8. Cabrera R, Ruiz J, Marco F, Oliveira I, Arroyo M, Aladuena A, et al. Mechanism of resistance to several antimicrobial agents in Salmonella clinical isolates causing traveler's diarrhea. Antimicrob. Agents Chemother 2004;48:3934-39.

www.SID.ir

Archive of SID

9. Fonseca EL1, Mykytczuk OL, Asensi MD, Reis EM, Ferraz LR, Paula FL, et al. Rodrigues. Clonality and antimicrobial resistance gene profiles of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Infantis isolates from four public hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. J Clin Microbiol 2006;44:2767-72.

10. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. M100-S25 2015;35:44-50.

11. Yang SJ, Park KY, Kim SH, No KM, Besser T, Yoo HS, et al. antimicrobial resistance in salmonella enterica serovars Entritidis and Typhimurium isolated from animal in Korea, comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. Vet Microbiol 2002;86:295-301.

12. Jones MA, Hulme SD, Barrow PA, Wigley P. The Salmonella Pathogenicity Island 1 and Salmonella pathogenicity island 2 type III secretion systems play a major role in pathogenesis of systemic disease and gastrointestinal tract colonization of Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken. Avian Pathol 2007;36:199-203.

13. Ranjbar R, Mohseni A, Moosavi A, Sarshar M, Ahmadi A, Izadi M. The Prevalence of Virulence Sodc1 and Sope1 Genes among the Clinical Serotypes of Salmonella enterica in Tehran, Iran. Journal of Military Medicine 2014; 16:125-31. [In Persian]

14. Ranjbar R, Naghouni A, Izadi M, Jonaidi Jafari N, Panahi Y. Isolation and antibiotic resistance pattern of Salmonella typhimurium. Journal of Military Medicine 2009;11:115-118. [In Persian]

15. Abdollahi A, Najafipour A, Kouhpayeh SA, Meshkibaf MH, Naghdi M. salmonella enterica: serotyping, drug resistance, extended spectrum of β- lactamase (ESBLs). Journal of Fasa Universily of Medical Sciences 2011;1:38-44. [In Persian]

16. Lin CC, Chen TH, Wang YC, Chang CC, Hsuan SL, Chang YC, et al. Analysis of ciprofloxacin-resistant Salmonella strains from swine, chicken, and their carcasses in Taiwan and detection of parC resistance mutations by a mismatch amplification mutation assay PCR. J Food Prot 2009;72:14-20.

17. Vo AT, van Duijkeren E, Fluit AC, Wannet WJ, Verbruggen AJ, Maas HM, et al. Antibiotic resistance, integrons and Salmonella genomic island 1 among non-typhoidal Salmonella serovars in The Netherlands. Int J Antimicrob Agents 2006;28:172-9.

18. Amini K, Zahraei Salehi T, Nikbakht G, Ranjbar R, Amin J, Ashrafganjooe SB. Molecular detection of invA and spv virulence genes in Salmonella enteritidis isolated from human and animals in Iran. Afr J Microbiol Res 2010; 4:2202-10.

19. Pezzella C, Ricci A, DiGiannatale E, Luzzi I, Carattoli A. Tetracycline and Streptomycin Resistance Genes, Transposons, and Plasmids in Salmonella enterica Isolates from Animals in Italy. Antimicrob Agents Chemother 2004;48:903-908.

20. Raffatellu M, Wilson RP, Chessa D, Andrews-Polymenis H, Lawhon S, Baumler AJ. SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 Contribute to Salmonella enterica Serotype Typhimurium Invasion of Epithelial Cells. Infect Immun 2005;73:146-54.

21. Dione MM, Ikumapayi U, Saha D, Mohammed NI, Adegbola RA, Geerts S, et al. Antimicrobial resistance and virulence genes of non-typhoidal Salmonella isolates in The Gambia and Senegal. J Infect Dev Ctries 2011;5:765-75.

www.SID.ir